

[文章编号] 1007-3949(2009)17-12-1009-04

· 临床研究 ·

# 普罗布考对 2 型糖尿病合并冠心病患者外周血单核细胞 Toll 样受体 4/核转录因子 $\kappa$ B 信号通路的影响

顾洪丰<sup>1,2</sup>, 陈忠平<sup>3</sup>, 杨永宗<sup>1</sup>

(南华大学 1 老年研究所, 2 生理学教研室, 3 附属第一医院, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 动脉粥样硬化; Toll 样受体 4 普罗布考; 2 型糖尿病; 核因子  $\kappa$ B

[摘要] 目的 研究普罗布考对 2 型糖尿病患者外周血单核细胞 Toll 样受体 4/核因子  $\kappa$ B 信号转导通路的影响, 以进一步探讨普罗布考抗动脉粥样硬化机制。方法 选择 85 例 2 型糖尿病合并冠心病患者, 随机分为对照组和治疗组; 对照组按常规治疗, 治疗组在常规治疗基础上加用普罗布考 0.375 g 每天 2 次, 口服, 总疗程为 24 周。运用 Real-time PCR、Western blotting 方法分别测定治疗前后外周血单核细胞 Toll 样受体 4/核因子  $\kappa$ B mRNA 和蛋白表达水平; ELISA 检测外周血血清中白细胞介素 1 $\beta$  的表达水平。结果 普罗布考显著降低 2 型糖尿病合并冠心病患者总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇和氧化型低密度脂蛋白水平, 显著下调外周血单核细胞 Toll 样受体 4 mRNA 和蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ), 明显减少核因子  $\kappa$ B 蛋白的表达, 且显著抑制白细胞介素 1 $\beta$  的生成 ( $P < 0.05$ )。结论 普罗布考抗动脉粥样硬化除了降脂作用外, 抑制外周血单核细胞 Toll 样受体 4/核因子  $\kappa$ B 信号转导通路的激活, 也可能是其抗炎、抗动脉粥样硬化的重要机制之一, 提示普罗布考对防治 2 型糖尿病并发动脉粥样硬化这类患者有一定的作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Effect of Probucol on the Expression of TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Type 2 Diabetic Mellitus Patients with Coronary Heart Disease

GU Hong-Feng<sup>1,2</sup>, CHEN Zhong-Ping<sup>3</sup>, and YANG Yong-Zong<sup>1</sup>

(1 Institute of Old Scholars, 2 Department of Physiology, 3 the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Toll Like Receptor 4; Probucol; Type 2 Diabetes; Nuclear Factor- $\kappa$ B

[ABSTRACT] **Aim** To study the influence of probucol on the Toll like receptor 4 (TLR4) /nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway of peripheral blood mononuclear cells in type 2 diabetic mellitus patients with coronary heart disease, so as to further investigate the anti-atherosclerosis mechanism of probucol. **Methods** 85 patients with type 2 diabetes and carotid atherosclerosis were divided into two groups: probucol treatment group ( $n=43$ ), and control group ( $n=42$ ). The treatment group were treated with probucol 0.375 g 2 times a day for 24 weeks. The effect of probucol on TLR4/NF- $\kappa$ B expression of peripheral blood mononuclear cells was detected by Real-time PCR and Western blotting analysis before and after probucol treatment. The expression of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) was detected by ELISA. **Results** Probucol obviously decreased levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) in plasma of type 2 diabetes. The expressions of TLR4/NF- $\kappa$ B and IL-1 $\beta$  of peripheral blood mononuclear cells were significantly lower in probucol treatment group than that in control ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Probucol can not only regulate serum lipids, but also has the action of anti-atherosclerosis through inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B expression, which indicate that probucol might have the preventive and treatment role in patients with type 2 diabetes and atherosclerosis.

心血管疾病是糖尿病患者的主要死亡原因, 约占其总死亡率的 70% ~ 75%<sup>[1]</sup>。目前对糖尿病合并冠心病的发病机制仍不完全清楚, 有学者认为慢

性炎症是二者共同的发病机理。动脉粥样硬化是一种免疫/炎症性疾病<sup>[2,3]</sup>, 近年来研究发现 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 参与动脉粥样硬化发病的各个环节<sup>[4,5]</sup>, 在动脉粥样硬化性心血管疾病的发生发展中具有重要作用。核因子  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 是一种调控基因表达的 DNA 结合蛋白, 其可通过调控细胞因子和黏附分子基因的表达, 参与机体的各种炎症和免疫反应。普罗布考主

[收稿日期] 2009-11-17 [修回日期] 2009-12-05

[作者简介] 顾洪丰, 博士研究生, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制及其防治。E-mail 为 gh513@sina.com。陈忠平, 博士, 副主任医师, 研究方向为糖尿病视网膜膜病变。通讯作者杨永宗, 教授, 博士研究生导师, E-mail 为 yzyanghy@163.com。

要作为降脂药,且具有强抗氧化作用;其显著抑制低密度脂蛋白的氧化修饰是其抗动脉粥样硬化的重要机制之一<sup>[6]</sup>。一些研究表明普罗布考还可通过抗炎机制发挥抗动脉粥样硬化作用,但其确切机制需要进一步的阐明。本研究旨在探讨普罗布考对2型糖尿病合并冠心病患者外周血单个核细胞 TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路的影响,探讨普罗布考对2型糖尿病患者的抗炎作用机制,为临床应用普罗布考防治糖尿病血管并发症提供一定的试验依据。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

选择2型糖尿病合并冠心病患者85例,冠心病的诊断:56例具有典型心绞痛发作特点,发作时心电图以R波为主的导联中ST段压低、T波低平或倒置;29例为无症状性心肌缺血,经冠状动脉造影后明确诊断。糖尿病诊断符合1999年WHO诊断标准。排除标准:各种糖尿病急性并发症、各种糖尿病慢性并发症(冠心病除外)、血液病、风湿病、肿瘤、慢性支气管炎、严重肝肾疾病及感染的患者、严重心脏病(近4周内心源性休克、不稳定型心绞痛、急性心肌梗死、美国心脏病学会NYHA标准心功能Ⅲ~Ⅳ级)、妊娠及哺乳期妇女。患者入选后分为两组:治疗组43例,男22例,女21例,年龄 $57.6 \pm 4.2$ 岁,病程 $8.9 \pm 1.8$ 年;对照组42例,男22例,女20例,年龄 $58.4 \pm 3.6$ 岁,病程 $8.6 \pm 2.1$ 年。两组病例在性别、年龄、病程、体质指数、血压、血糖、血脂、肱动脉及颈动脉超声检测指标等因素具有可比性。

### 1.2 方法

所有入选患者均在生活方式干预的同时进行口服降糖药和/或胰岛素强化治疗,每月至少随访1次,控制目标:空腹血糖 $\leq 7.0$  mmol/L且糖化血红蛋白 $\leq 6.5\%$ ,收缩压 $\leq 130$  mmHg且舒张压 $\leq 85$  mmHg甘油三酯(TG) $\leq 1.65$  mmol/L且总胆固醇(TC) $\leq 4.68$  mmol/L,低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C) $\leq 2.6$  mmol/L。治疗组在此基础上加0.375 g普罗布考(商品名之乐,山东齐鲁制药有限公司,每粒0.125 g),每日2次;总疗程24周。所有受试者均于治疗前后作相关血液检查。

### 1.3 血脂测定

空腹12 h次日清晨抽取静脉血送检。用日立76002020全自动生化分析仪检测TG、TC、LDL-C、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C);氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)试剂盒由Uscn Life & Technology Company

提供,用ELISA检测,操作按试剂盒说明书进行。

### 1.4 Real-time PCR检测外周血单核细胞TLR4 mRNA水平

治疗前后分别采取静脉血30 mL,肝素抗凝,用淋巴细胞分离液分出单个核细胞,按E.Z.N.A Total RNA Kit说明书提取总RNA。以提取的总RNA为模板,按照逆转录试剂盒(MBI公司)说明书进行逆转录反应,合成cDNA第一链, -20℃保存。在NCBI数据库中查询 $\beta$ -actin和TLR4应用Perkin-Elmer Applied Biosystems提供的PrimeExpress Software设计引物与探针(由上海生物工程有限公司合成;表1)。以制备的细胞克隆cDNA为模板,分别扩增 $\beta$ -actin和TLR4。选取cDNA样品进行10倍梯度稀释,分别进行Real-time PCR反应,得出荧光曲线,通过cDNA浓度梯度的Log值对 $\Delta$ CT值作图比较两基因扩增效率。反应条件:95℃预变性10 s,95℃变性5 s,60℃退火及延伸40 s进行40个循环。配好反应体系后,将各个样品逐一加入96孔板中,每个样品设置3个复孔。Real-time PCR反应在ABI7500(美国AB公司)的实时定量PCR系统上进行,重复3次。样品设置相同的阈值线,应用SPSS13.0统计软件计算重复样品间CT均值及标准偏差,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法处理数据。

表1. Real-time PCR所用的引物和探针序列

名称	序列	PCR产物
TLR4-F	5'-ACT GGG TGA GAA ATG AGC TGG TA-3'	96 bp
TLR4-R	5'-TGG CTA CAC CAG GAA TAA AGT CTC T-3'	
TLR4探针	FAM-5'-AAT TTA GAA GAA GAA GTG CCC GCT-3'-TAMRA	
$\beta$ -actin-F	5'-CCG GGA CCT GAC AGA CTA CCT-3'	97 bp
$\beta$ -actin-R	5'-CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT T-3'	
$\beta$ -actin探针	FAM-5'-AAG ATC CTG ACC GAG CGT GGC TA-3'-TAMRA	

### 1.5 Western blotting检测外周血单核细胞TLR4和NF- $\kappa$ B蛋白的表达

将分离的外周血单核细胞加入细胞裂解液中裂解后,4℃、12 000 g离心7 min,小心吸出上清液,用BCA法进行蛋白质定量。取50  $\mu$ g蛋白质/泳道加入等体积5 $\times$ SDS凝胶加样缓冲液,煮沸使蛋白变性;60 V积层胶,120 V分离胶,电泳分离细胞蛋白质,60-100 mA 1 h将蛋白质用半干转膜仪转移至PDVF膜上。5%脱脂牛奶室温封闭2 h后,分别加入兔抗小鼠TLR4、NF- $\kappa$ B一抗,4℃孵育6~12 h,

TBST洗膜 5~10 min × 3次;加入辣根过氧化物酶标记的二抗,4℃孵育 4~8 h;TBST洗膜 5~10 min × 3次;然后用 Western blotting 荧光检测试剂激发荧光,显示于 X光片,显影,定影后进行图像分析。

### 1.6 ELISA 检测外周血血清白细胞介素 1 $\beta$ 水平

治疗前后分别采取静脉血 30 mL,肝素抗凝,于 4℃放置 24 h 待血液凝固后,常温下 3 000 r/min 离心 5 min,小心吸取上层血清。按 ELISA 试剂盒说明书操作,即刻测量标本 OD<sub>450</sub>值,根据说明书绘制标准曲线,并根据标准曲线查找其对应的浓度范围;每组样品点 3孔。

### 1.7 统计学方法

采用治疗前后自身对照比较的 *t* 检验,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 13.0 统计软件进行处理。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 普罗布考对 2 型糖尿病合并冠心病患者血脂的影响

普罗布考治疗 24 周后,治疗组 TC、TG 和 LDLC 分别降低 24%、10% 和 17%, ox-LDL 降低 27%,与治疗前比较差异显著 ( $P < 0.05$ , 表 2)。

表 2 普罗布考对 2 型糖尿病合并冠心病患者血脂的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)

分 组	TC	TG	LDLC	HDLc	ox-LDL
治疗组 ( $n = 43$ )					
治疗前	4.63 ± 0.85	1.14 ± 0.47	2.44 ± 0.82	1.37 ± 0.43	0.85 ± 0.11
治疗后	3.72 ± 0.67 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.32 <sup>a</sup>	2.03 ± 0.53 <sup>a</sup>	1.33 ± 0.47	0.62 ± 0.08 <sup>a</sup>
对照组 ( $n = 42$ )					
治疗前	4.65 ± 0.76	1.12 ± 0.54	2.42 ± 0.66	1.38 ± 0.37	0.83 ± 0.08
治疗后	4.74 ± 0.63	1.18 ± 0.41	2.48 ± 0.72	1.41 ± 0.52	0.88 ± 0.13

a为  $P < 0.05$  与对照组及治疗组治疗前比较。

### 2.2 普罗布考对 2 型糖尿病合并冠心病患者外周血单核细胞 TLR4 mRNA 表达的影响

对照组 TLR4 mRNA 表达水平为  $0.81 \pm 0.19$ , 治疗组 TLR4 mRNA 表达水平  $0.43 \pm 0.12$ , 普罗布考治疗后外周血单核细胞 TLR4 mRNA 的表达显著减少 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 普罗布考对 2 型糖尿病合并冠心病患者外周血单核细胞 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达的影响

对照组外周血单核细胞 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达显著增强,而普罗布考治疗后外周血单核细胞 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达较对照组显著减少 ( $P < 0.05$ , 表 3 和图 1)。

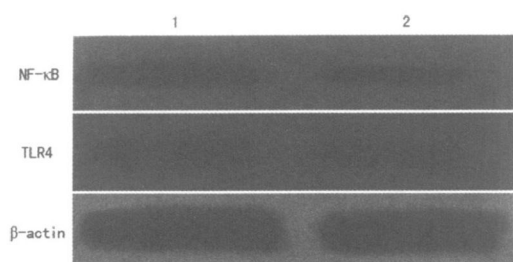


图 1 普罗布考对 2 型糖尿病患者外周血单核细胞 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达的影响 1 为对照组; 2 为治疗组。

表 3 外周血单核细胞 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	TLR4	NF- $\kappa$ B
治疗组 ( $n = 43$ )	$0.29 \pm 0.07^a$	$0.23 \pm 0.09^a$
对照组 ( $n = 42$ )	$0.62 \pm 0.18$	$0.48 \pm 0.14$

a为  $P < 0.05$  与对照组比较。

### 2.4 普罗布考对 2 型糖尿病合并冠心病患者外周血血清白细胞介素 1 $\beta$ 水平的影响

治疗组白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 水平为  $127.33 \pm 32.36$  ng/L, 对照组 IL-1 $\beta$  水平为  $234.92 \pm 46.11$  ng/L, 普罗布考治疗后外周血血清 IL-1 $\beta$  水平显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

2 型糖尿病患者易发生炎症和动脉粥样硬化, 而慢性炎症是动脉粥样硬化的致病因素之一, 因此认为慢性炎症是 2 型糖尿病与动脉粥样硬化等心血管疾病的共同病理学机制。近几年研究发现亚临床炎症与糖尿病的发生、发展及其并发症有密切的关系<sup>[7]</sup>。糖尿病患者无论有无并发动脉粥样硬化, 其体内炎症因子水平均显著高于正常人群, 而炎症因

子水平目前认为是动脉粥样硬化发病的重要因素及预测指标,因此推测炎症反应的增强可能是糖尿病并发动脉粥样硬化的机制之一。

Toll样受体 (TLR)是模式识别受体之一,在先天性免疫的病原识别中起作用,而且与获得性免疫有关<sup>[8]</sup>。TLR4已被证明与糖尿病<sup>[9]</sup>、动脉粥样硬化等炎症性疾病有关。研究表明糖尿病患者 TLR4的高表达,TLR4的激活触发了促炎细胞因子和趋化因子的释放,导致炎症反应的发生和发展,其信号通路的激活在糖尿病的发生发展中有着重要作用<sup>[10]</sup>。单核/巨噬细胞是机体防御感染的主要细胞之一,在动脉粥样硬化的发生、发展中有着重要作用。本研究发现,2型糖尿病患者单核细胞 TLR4 mRNA 和蛋白表达水平显著增高,NF- $\kappa$ B蛋白的表达显著增加,血清中 IL-1 $\beta$ 表达增加,这表明2型糖尿病患者外周血中单核细胞 TLR4/NF- $\kappa$ B信号转导通路被激活。Chac $\cdot$ n等<sup>[11]</sup>研究显示,TLR4配体 LPS作用后,2型糖尿病患者单核细胞产生的炎症因子 TNF- $\alpha$ 比正常人单核细胞所生成的显著增加。这表明 TLR4激活与2型糖尿病的炎症、感染有关。Edfeldt等<sup>[12]</sup>在动脉粥样硬化的斑块中发现 TLR4的表达显著提高,并证实正是通过 TLR4的识别功能导致一系列与动脉粥样硬化相关的致炎细胞因子的合成与释放。我们的研究表明,TLR4抑制剂干预的载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>小鼠的主动脉动脉粥样硬化病变显著减轻<sup>[13-14]</sup>。

普罗布考主要作为降脂药,但同时具有强抗氧化作用;其还能显著抑制低密度脂蛋白的氧化修饰,这被认为是其抗动脉粥样硬化的重要机制之一。一些研究表明普罗布考还可通过抗炎等机制发挥动脉粥样硬化的作用。本研究结果发现,2型糖尿病合并冠心病患者经普罗布考治疗24周后,2型糖尿病患者体内的 ox-LDL水平显著降低,外周血单核细胞 TLR4 mRNA 和蛋白的表达显著减少。由此可见普罗布考能显著减轻2型糖尿病患者炎症因子的生成。我们实验室先前的研究表明,ox-LDL能显著上调 THP-1细胞 TLR4的表达,增加 IL-1 $\beta$ 、IL-6和 TNF- $\alpha$ 等炎症因子的表达;促进单核细胞和内皮细胞的黏附这些作用能被 TLR4的阻断剂所抑制。因此,2型糖尿病患者体内 ox-LDL水平升高,ox-LDL等配体与 TLR4结合后致使 TLR4/NF- $\kappa$ B激活,进而释放大量的炎症因子,这可能是2型糖尿病患者动脉粥样硬化发生率增加的机制之一。杨清武等<sup>[15]</sup>研究表明,普罗布考除具有调脂作用外,还可

通过抑制 ox-LDL诱导的体外培养的人脐静脉内皮细胞 TLR4受体的表达和抑制单核细胞与内皮细胞黏附、聚集发挥抗炎作用。这提示普罗布考则可能通过减少 ox-LDL的生成,下调 TLR4、NF- $\kappa$ B的表达和减少炎症因子的释放来减轻2型糖尿病患者炎症应答,进而抑制其动脉粥样硬化的发生。

综上所述,2型糖尿病患者外周血单核细胞 TLR4通路参与了2型糖尿病的炎症反应,这可能是2型糖尿病患者易患冠心病等动脉粥样硬化性心血管疾病的原因之一。普罗布考除了降脂作用以外,还能通过下调 TLR4表达,抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B介导的炎症反应,可能是其抗动脉粥样硬化的新的作用机制,这可能可能会成为2型糖尿病及其并发症防治的靶点,但其确切的作用机制需要进一步的阐明。

#### [参考文献]

- [1] Candito R, Srivastava P, Cooper ME, et al. Diabetes mellitus: a cardiovascular disease [J]. *Curr Opin in Investig Drugs*, 2003, 4 (9): 1088-094
- [2] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340 (2): 115-126
- [3] Hansson GK, Libby P. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Circulation Research*, 2002, 91: 281-291
- [4] Mullick AE, Tobias PS, Curtiss LK. Toll-like receptors and atherosclerosis [J]. *Immunologic Research*, 2006, 34 (3): 193-209
- [5] Xu XH, Shah PK, Faure E, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and up-regulated by oxidized LDL [J]. *Circulation*, 2001, 104: 3103-108
- [6] 陈临溪, 余麟. 丙丁酚防治动脉粥样硬化新进展 [J]. 国外医学·生理病理科学与临床分册, 1996, 16 (4): 1052-053
- [7] Padhan AD, Rilkker PM. Do atherosclerosis and type 2 diabetes share a common inflammatory basis [J]? *Eur Heart J*, 2003, 23: 831-834
- [8] Michelsen KS, Doherty TM, Shah PK, et al. An emerging bridge from innate immunity to atherogenesis [J]. *J Immunol*, 2004, 173: 5901-907
- [9] Reyna SM, Ghosh S, Tantiwong P, et al. Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects [J]. *Diabetes*, 2008, 57 (10): 2595-602
- [10] Kim JK. Fat uses a TOLL-road to connect inflammation and diabetes [J]. *Cell Metab*, 2006, 4 (6): 417-419
- [11] Chac $\cdot$ n MR, Vendrell J, Miranda M, et al. Different TNF $\alpha$  expression elicited by glucose in monocytes from type 2 diabetes mellitus patients [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 194 (2): e18-25
- [12] Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, et al. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions—a possible pathway for plaque activation [J]. *Circulation*, 2002, 105 (10): 1158-161
- [13] 顾洪丰, 周浩, 杨永宗, 等. 抑制 Toll样受体 4对 apoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化病变的影响 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36 (9): 1165-171
- [14] 顾洪丰, 李方, 何飏, 等. 表没食子酸儿茶精-3-表没食子酸酯对载脂蛋白 E基因敲除小鼠主动脉粥样硬化形成和 Toll样受体 4及单核细胞趋化蛋白 1表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15 (7): 560
- [15] 杨清武, 牟玲, 王琳, 等. 普罗布考对氧化修饰低密度脂蛋白诱导的人内皮细胞 Toll样受体 4表达及单核内皮细胞黏附功能的影响 [J]. *中国临床康复*, 2005, 9 (7): 75-77

(此文编辑 文玉珊)